

Aus dem II. Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Willy Schwarz

Elektronenmikroskopische Untersuchungen
über die Entstehung des Pigmentepithels
bei der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ilse Kunz
aus Welzheim/Württ.

1973

Aus dem II. Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Willy Schwarz

Elektronenmikroskopische Untersuchungen
über die Entstehung des Pigmentepithels
bei der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ilse Kunz
aus Welzheim/Württ.

Referent: Professor Dr. Merken
Korreferent: Professor Dr. Thies

Gedruckt mit Genehmigung der
medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promotionsdatum: 8. Oktober 1973



Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Material und Methode	7
Befunde	9
Diskussion	13
Zusammenfassung	17
Literaturverzeichnis	
Lebenslauf	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Das Auge entwickelt sich aus drei verschiedenen Gewebsformationen. Während die Netzhaut ein Hirnderivat ist, bildet sich die Linse aus dem Ektoderm, die Gefäßhaut und die fibröse Augenhaut dagegen aus dem Mesenchym.

Die Augenbildung beginnt am Mittelhirn mit der Anlage zweier lateraler Sehplatten. Die Platten, die anfangs nur Wandverdickungen des Neuralrohrs sind, wölben sich nach lateral aus und wachsen als Augenblasen vor. Die Blasen stehen über je einen Stiel mit dem Mittelhirn in Verbindung. Der Stiel wird später zum fasciculus opticus.

Die äußerste Kante jeder Augenblase berührt das Ektoderm und induziert dort die Linsenbildung. Das anliegende Ektoderm verdickt sich zur Linsenplatte. Gleichzeitig beginnt sich die Augenblase zum Augenbecher einzustülpen. Dabei entstehen zwei dicht aufeinander liegende Wandschichten: Die innere, dickere Schicht des Augenbechers bildet die Anlage der neutralen Retina, die äußere, dünnere Schicht die Anlage des Pigmentepithels der Netzhaut.

Die Linsenblase des Ektoderms wölbt sich während dieser Vorgänge als Linsengrube in den Augenbecher. Durch weitere Vertiefung der Grube und Verwachsung der Ektodermränder wird die Linsenblase abgeschnürt. Durch differente Wachstumsgeschwindigkeit in Augenbecher und Linse vergrößert sich der Raum zwischen Retina und Linse, der sich bald mit einer Gallerte, dem Glaskörper, ausfüllt.

(Starck, 1965; Clara, 1967; Beninghoff/Goerttler, 1964; Rohen, 1964)

Die Entwicklung des Pigmentepithels

Während über die Feinstruktur und die Funktion des Pigmentepithels der Retina in den letzten Jahren viele Kenntnisse erworben wurden (Bernstein, 1960, 1961; Dowling and Gibbons, 1962; Bairati and Orzalesi, 1963; Lasansky and de Fisch, 1966; Leeson and Leeson, 1966; Leure-du Pree, 1968), ist über die funktionellen und morphologischen Veränderungen während ihrer Entwicklung noch wenig bekannt und veröffentlicht (Dowling and Gibbons, 1962; Breathnach and Wyllie, 1966). Besonders die Pigmentepithelentwicklung bei dem so häufig benutzten Laboratoriumstier, der Ratte, bietet noch viele Lücken.

Die Pigmentepithelzelle der Rattenembryonen ist am 15. Schwangerschaftstag (6. pränataler Tag) kubisch bis polygonal und noch vollkommen undifferenziert (Braekevelt and Hollenberg, 1970).

Am 5. pränatalen Tag nimmt die Zelle eine mehr rechtwinklige Gestalt an, bildet granuläres endoplasmatisches Reticulum und enthält eine supranucleäre Golgi-Zone. Polysomen sind weiterhin zahlreich. Trotz relativ glatter Zelloberflächen entstehen durch Cytoplasmaverdichtungen unterhalb benachbarter Zellmembranen (Lieb u. Knauf, 1963) Kontaktstellen, die am 8. oder 9. postnatalen Tag voll entwickelt sind. Dieses sogenannte "terminal bar"-System (Zonulae occludentes) ist für das adulte Pigmentepithel der Retina charakteristisch (Yamada, Tokoyasu and Iwaki, 1958; Fine, 1961; Leure-du Pree, 1968) und entspricht der Membran, die von Verhoeff (1903) in einer lichtmikroskopischen Studie beschrieben wird.

Propigmentgranula treten zu diesem Zeitpunkt (5. pränataler oder Tag 16 der Schwangerschaft) zum ersten

Mal im apikalen Zellgebiet auf. Die typischen Apikalen Epithelzellenfortsätze erscheinen erstmals am 3. pränatalen Tag und liegen unmittelbar den in Entwicklung begriffenen Photorezeptorengliedern an. Auch sind verstreute osmiophile Körperchen sichtbar (Braekevelt and Hollenberg, 1970). Die lateralen Zellverbindungen sind jetzt deutlicher und mehr nach choroidal gelegen.

Am Tag vor der Geburt enthält das Cytoplasma des Pigmentepithels zahlreiche Organellen und elektronendichte Einschlusskörperchen. Die Propigmentgranula im apikalen Cytoplasma sind zahlreich und unterschiedlich groß.

Am 5. postnatalen Tag besetzen Fortsätze des Pigmentepithels die gesamte innere Epitheloberfläche und bleiben während ihrer Entwicklung an die Innenglieder der retinalen Photorezeptoren angelagert, bis sie am 8. neonatalen Tag die Innenglieder völlig umschließen (Braekevelt and Hollenberg, 1970; Matsusaka, 1967).

Die basalen Einstülpungen ("basal infoldings") sind anfangs mehr isoliert angelegt, dehnen sich dann aber aus bis sie fast die ganze Oberfläche bedecken.

In den Propigmentgranula, deren innere Struktur aus parallelen Membranen besteht, findet bei den üblichen Laboratoriumsratten vom Albinotyp keine Melaninablagerung statt. Dennoch scheinen sie sich bis zur Pigmentbildung normal zu entwickeln. Dann verhindert jedoch der genetische Block die Melanisation und anschließend verschwindet das Granulum. Die pigmentlosen Pigmentgranula sind am 12. postnatalen Tag am zahlreichsten, und sind vollkommen verschwunden, wenn das Tier

25 - 30 Tage alt ist (Dowling and Gibbons, 1962). Diese Vorstellungen scheinen aber noch nicht völlig geklärt zu sein und bedürfen zweifellos noch neuer Untersuchungen und Befunde.

Entstehung der Prämelanosomen

Über die Entstehung der Prämelanosomen, der Orte der intrazellulären Melaninsynthese (Seija, Fritzpatrick, and Birbeck, 1961; Nakai u. Shubik, 1964; Seiji and Iwashiti, 1965; Moyer, 1966) wurden verschiedene Theorien aufgestellt.

Die Annahme, der Golgi-Apparat sei Ursprung der Prämelanosomen, stützt sich auf Befunde elektronenmikroskopischer Untersuchungen an verschiedenen Geweben und Tierarten. (Birbeck, Mercer and Barnicot, 1956; Clark and Hibbs, 1958; Wellings and Siegel, 1959, 1963; Birbeck, 1962, 1963; Dalton and Felix, 1953; Dalton, 1959; Drochmans, 1960; Barnicot and Birbeck, 1958; Francois, Rabaey and Lagasse, 1963; Hu and Cardell, 1964; Breathnach and Wyllie, 1966). Diese Theorie wurde durch biochemische Untersuchungen von Zellfraktionen gestützt (Seiji, Shumao, Birbeck and Fritzpatrick, 1963; Seiji, 1965; Seiji and Iwashita, 1965; Seiji, 1967).

Elektronenmikroskopisch-cytochemische Untersuchungen an Melanomzellen (Novikoff, Albala and Biempica, 1968; Stanka, Kinzel und Mohr, 1969) am Pigmentepithel von Hühnerembryonen (Stanka, 1969, 1970a), an Melanocyten der menschlichen Epidermis (Hunter, Mottaz and Zelickson, 1970), sowie an den Haarwurzeln pigmentierter Ratten (Stanka, 1970b) deuten ebenfalls auf eine Beteiligung des Golgi-Apparates beim Transport der

Tyrosinase hin.

Die Vorbildung der Prämelanosomen aus dem endoplasmatischen Reticulum und anschließende Übertragung der Tyrosinase durch den Golgi-Apparat, leiteten Stanka, Künzel und Mohr, 1969; Stanka, 1970a aus dem Fehlen der Tyrosinase -Aktivität im frühen Prämelanosomenstadium bei Melanomzellen und beim Pigmentepithel ab.

Hingegen werden von Moyer (1961, 1963) allein die Zisternen des endoplasmatischen Reticulums als Ursprung der Granula bezeichnet. Er fand in der Mäuse-retina 6 Entwicklungsstadien der Pigmentkörnchen. Ähnliche Vorstufen wurden von Lerche, (1962, 1963); Weissenfels (1956); Feeney, Aal (1965); Lerche und Wulle (1967); Maul (1969); Epping (1970) und Stanka (1971) beschrieben. Es bestehen lediglich strukturelle Detailunterschiede, z. B. einer filamentären an Stelle der lamellären Innenstruktur der Prämelanosomen.

Die Entwicklung der Prämelanosomen kann deshalb nach dem neuesten Stand der Literatur zusammengefaßt etwa folgendermaßen beschrieben werden:

Die Pigmentepithelzellen enthalten, besonders im apikalen Bereich, zahlreiche schmale und verhältnismäßig lange Zisternen des rauhen endoplasmatischen Reticulums, deren Inhalt meist uncharakteristisch flockig-filamentär ist. Daraus entstehen Filamente von ungefähr 95 Å Dicke, die sich grob parallel anordnen. Gleichzeitig geht der Ribosomenbesatz verloren. In diesen membranbegrenzten Hohlräumen entwickeln sich dann die typischen gefalteten oder

spiralgewundenen Lamellen der Prämelanosomen. Hier an den Matrixlamellen geht die Melaninsynthese vor sich und schlägt sich bei der Entwicklung der Melanosomen Melanin nieder. Vorher werden wahrscheinlich aber noch Vesikel des Golgi-Apparates (Stanka, 1970a) notwendige Substanzen zu diesen Prämelanosomen transportiert und sich mit ihnen vereinigt haben.

Die Prämelanosomen sind bis zu 0,5 μm breit, bis 1,5 μm lang und werden von einer Elementarmembran umgeben.

Im nächsten Stadium verdicken sich die Lamellen durch Melaninanlagerung und innerhalb der Grenzmembran werden kleine Vesikel von ca. 310 Å Durchmesser sichtbar, die wahrscheinlich durch Membranvesikulation entstehen. Diese Vesikel sind als Aufhellungen sichtbar. Durch weitere Melaninablagerung wird die Fasermatrix völlig verdunkelt, so daß die zugrunde liegende Struktur nur noch auf sehr dünnen Schnitten, wenn überhaupt, sichtbar wird. Aus der Literaturübersicht geht hervor, daß der morphologisch faßbaren Differenzierung der Pigmentepithelzelle, abgesehen von der eigentlichen Melanosomenentstehung, bis jetzt noch wenig Beachtung geschenkt worden ist. Die Befunde über die Feinstrukturwandlung während der Schritte von der undifferenzierten zur differenzierten Pigmentepithelzelle sind spärlich.

Auch die Entwicklung der Melanosomen selbst ist teilweise noch umstritten. Um aber Augenmißbildungen im Rahmen teratologischer Untersuchungen genauer erfassen zu können, ist es zweifellos notwendig, sowohl

die genaue zeitliche Sequenz der Ereignisse bei dem verwendeten Tierstamm, als auch die dabei ablaufenden morphologischen Veränderungen in allen Einzelheiten zu kennen. Aus diesen Gründen untersuchten wir in der Retina-Anlage eines bestimmten Wistar-Rattenstammes (Paderborn FW 69) sowohl die Differenzierung der Melanocytenzelle, um Anhaltspunkte zu bekommen, wann die einzelnen Differenzierungsschritte stattfinden, als auch, um zu morphologischen Problemen der Prämelanosomenentstehung Stellung nehmen zu können. Zweifellos fehlen noch bei vielen der üblichen Laboratoriumstiere solche Befunde.

Material und Methode

Als Untersuchungsmaterial wurde ein Ratten Wistar-Stamm Paderborn FW 69 verwendet. Die Bestimmung der Schwangerschaftsdauer konnte genau durchgeführt werden: Nachdem die Tiere an einen veränderten Tag-Nacht-Rhythmus adaptiert waren, wurden weibliche Tiere im Östrus vormittags zwischen 7.30 und 9.30 mit Böcken gepäart. Um 8.00 Uhr waren bereits 80% der weiblichen Tiere spermienpositiv, und wir konnten deshalb diesen Zeitpunkt als Stunde 0 = Schwangerschaftsbeginn festsetzen. Damit entsprechen die folgenden 24 Stunden dem Tag 0. Die Stundenzahlen können ebenfalls berücksichtigt werden, wenn sie auf 8.00 Uhr bezogen werden.

Rattenembryonen vom Tag 11 bis zur Geburt (Tag 21) wurden in dieser Arbeit verwendet.

Die sofortige Fixierung des Keimes in toto erfolgte nach Dekapitation des Muttertieres und Schnittentbindung. Den Kopfabschnitt mit dem Pigmentepithel isolierten wir noch in der Fixierungslösung.

Die Fixierungslösung war ein modifiziertes Karnovsky-Gemisch mit folgender Zusammensetzung:

3 % Glutaraldehyd, 3 % Paraformaldehyd in 0,1 m Cacodylatpuffer (pH 7, 2).

Nachdem das Präparat 3 Stunden fixiert und anschließend in der Pufferlösung gewaschen war, wurde es in 1 %igem gepuffertem (0,1 m Cacodylatpuffer, pH 7,2) Osmiumtetroxid für eine Stunde nachfixiert.

Nach stufenweiser Entwässerung in der Acetonreihe erfolgte die Einbettung in Mikropal (Firma Ferak, Berlin).

Die Schnitte wurden mit dem LKB-Ultratom und dem Reichert-Mikrotomen hergestellt.

Für die Kontrastierung benutzten wir Uranylacetat und Bleicitrat. Ein Teil der zur elektronenmikroskopischen Untersuchung bestimmten Präparate wurde mit der Ruthenium-Methode nach Myers et al. (1969) zusätzlich behandelt (1,4 % Glutaraldehyd in 0,1 m Cacodylatpuffer mit 800 ppm Rutheniumrot und Nachfixierung in 2 %iger Osmiumtetroxidlösung mit 400 ppm Rutheniumrot).

Bei einer Primärvergrößerung von 1000-40000 und einer Strahlspannung von 80kV wurden die Aufnahmen an Siemens Elmiskopen vom Typ 1 und 1 A hergestellt.

An dreieinhalbfachen Papiervergrößerungen erfolgte die Auswertung.

Zur Lokalisation und Kontrolle der Schnittebene wurden vor Anfertigung der Dünnschnitte sogenannte Semidickschnitte hergestellt, die nach Färbung mit alkalischer

wässriger Giemsalösung bei 60° C lichtmikroskopisch gut zu beurteilen sind.

Befunde

Im Folgenden sollen nur die Stadien der Entwicklung der Pigmentepithelzelle beschrieben werden, die für unsere Fragestellung wichtig sind:

Von der Bildung des Augenbechers bis zum Auftreten der ersten typischen Pigmenteinschlüsse (Melanosomen).

Bei dem von uns verwendeten Rattenstamm betrifft das die Tage 12 - 16.

Lichtmikroskopie:

Am 16. Tag lassen sich bereits lichtmikroskopisch zarte Melanosomen nachweisen, so daß ihre Entwicklung in die Zeit davor zu lokalisieren ist. Nach Erreichen der endgültigen Position des Augenfortsatzes unter dem lateralen Kopfektoderm und dem Abschluß der Becherbildung etwa am späten Tag 11 oder frühen Tag 12 besteht das prospektive Pigmentepithel aus einer einschichtigen Lage kubischer Zellen.

Elektronenmikroskopie:

Am Tag 12 lassen die späteren Pigmentepithelzellen noch keine morphologischen Kennzeichen ihrer späteren Differenzierungsrichtung aufweisen. Zum Mesenchym hin erfolgt die Abgrenzung bereits durch eine dünne (300Å), aufgelockerte Basalmembran. Die Zellgrenzen sind relativ glatt, nur lateral und apikal kommen einige kurze, stummelförmige Fortsätze vor. Der Zellapex wölbt sich buckelförmig in den Ventrikel, d.h. in Richtung auf die innere Retinazellschicht vor, der aber bereits

zu diesem Zeitpunkt fast völlig verschlossen ist. Auf langen Strecken verlaufen die Membranen benachbarter Zellen in einem Abstand von ca. 200 Å parallel nebeneinander her.

Nur an einigen umschriebenen Stellen, besonders dort, wo die Fortsätze lokalisiert sind, kommt es zu einer Erweiterung des Interzellularraums. Am Zellapex, wo sich die Membranen benachbarter Zellen zuerst treffen, entsteht eine besondere Kontaktzone, die sich kontinuierlich gürtelförmig um die Zelle herumzieht. An diesen Stellen fließen die äußeren Lamellen der doppelt konturierten Zellmembranen zusammen und der Interzellularraum verschwindet. Gleichzeitig verdichtet sich häufig das anliegende Cytoplasma. Kontaktspezialisierungen dieser Art werden als "Zonulae occludentes, tight junction oder terminal bars" bezeichnet und entsprechend etwa dem "Schlußleisten-netz" der alten Histologen.

Im Cytoplasma selbst überwiegen freie Ribosomen, die fast ausschließlich gruppiert als Polysomen vorkommen. Einzelne, kurze und enge Hohlräume des endoplasmatischen Reticulums mit Ribosomenbesatz kommen vor. In der Nähe des Kernes liegt der Golgi-Apparat, der zu diesem Zeitpunkt (Tag 11/12) noch relativ klein ist. Er besteht nur aus wenigen und kurzen, flachen Säcken und ist sonst ~~fast~~ überwiegend aus Vesikeln aufgebaut. Die Mitochondrien sind rund bis oval, ihre durchschnittliche Länge erreicht höchstens 1 Mikron. Sie enthalten einige, nur wenig geordnete cristae, die in einer feingranulären Matrix liegen. Häufig fehlt aber diese Matrix, mindestens an einigen umschriebenen Stellen.

Neben diesen Cytoplasmabestandteilen können noch die nur selten oder in geringer Zahl vorkommenden Vesikel und elektronendichten Granula erwähnt werden.

Ab späten Tag 12 lassen sich in der Pigmentepithelschicht in zunehmenden Maße Strukturen nachweisen, die als Praemelanosomen bezeichnet werden. Es handelt sich um runde, ovale oder spindelige membranbegrenzte Einschlüsse, die eine geordnete Innenstruktur erkennen lassen. Bei höheren Vergrößerungen sieht man etwa 100 - 120 Å dicke Lamellen, die meistens mehr oder weniger parallel gepackt, senkrecht oder parallel zur Längsachse des Einschlusses oder sogar zirkulär verlaufen. Das elektronenmikroskopische Bild hängt natürlich sehr von der Schnittrichtung durch diese Prämelanosomen ab. Aus der Vielzahl der Schnitte ergibt sich ein dreidimensionales Bild der Innenstruktur:

Es muß sich mit großer Wahrscheinlichkeit um 100-120 Å dicke Platten handeln, deren Breite meistens geringer ist als ihre Länge. Schneidet man sie in der Längsrichtung quer, füllen sie gestreckt oder zirkulär verlaufend den Einschluß aus. Schneidet man sie im rechten Winkel dazu, findet man nur kurze Lamellen, die den Einschluß nicht vollständig ausfüllen. Bei einer parallel zur Plattenstellung verlaufenden Schnittrichtung lassen sich keine weiteren Einzelheiten darstellen, da die Platten im Schnitt zum Schnitt parallel verlaufen. Bei höherer Vergrößerung erkennt man, daß diesen lamellenartigen Verdichtungsplatten feine Granula in regelmäßiger Folge aufsitzen. Auf einer Seite liegen sie bei einer eigenen Größe von 60-80 Å ungefähr ebenso weit auseinander. Häufig liegen die feinen

Granula der anderen Seite dazu versetzt, das heißt, sie stehen auf Lücke. Neben diesen typischen Strukturen im Inneren der Praemelanosomen finden wir ein freingranuläres bis feinfädiges Material, das als Matrix bezeichnet wird. Nur ganz selten lassen sich etwa am Tag 14 solche Praemelanosomen darstellen, die beginnen, Melanin einzulagern. Dieser Vorgang wird im Elektronenmikroskop deutlich durch eine Vergrößerung der Praemelanosomen und eine Vergrößerung ihrer Struktur. Dabei werden die Lamellen im Inneren der Praemelanosomen auf den Platten stark elektronendichte, unterschiedlich große (300 Å) Granula abgelagert, die zunächst den Plattenverlauf hervorheben, dann aber zunehmend maskieren. Die feine, häufig regelmäßig periodische Zeichnung dieser Platten, die durch den regelmäßigen Besatz der kleinen Granula zustande kommt, geht dabei natürlich verloren.

Die typischen Praemelanosomen ohne Melaninbesatz bleiben bis zur Geburt und auch danach noch das typische cytologische Kennzeichen der Pigmentepithelzelle. Zwischendurch aber, von uns aus beobachtet am 15. und 16. Tag, gehen in den Pigmentepithelzellen noch Abbauvorgänge vor sich. Einzelne, aber auch gruppiert liegende Praemelanosomen, besonders aber diejenigen mit Melaningehalt werden durch eine Membran vom übrigen Cytoplasma abgegrenzt, d.h., sequestriert. In diesen so entstehenden membranbegrenzten Hohlräumen gehen jetzt morphologisch faßbare Abbauvorgänge vor sich: Fragmentierung der Membranen, granulärer Zerfall der übrigen Strukturen und Verdichtung des Inhaltes. Es sind also hier typische

Cytolysomen entstanden, die praemelanotische Einschlüsse abbauen.

Diskussion

Die Stadien der Praemelanosomenentwicklung, von der Bildung der Matrixlamellen bis zum fertigen Praemelanosom unterscheiden sich bei der Albinoratte nicht von denen der normalen Wildratte.

Nach diesen Befunden muß vermutet werden, daß die Melanosomenentstehung im rauen endoplasmatischen Reticulum der Pigmentepithelzellen beginnt. Der morphologische Ausdruck dieser Vorgänge dürfte der dichte, homogen bis feingranulierte Inhalt dieser Hohlräume sein.

Derartige Synthese- und Stapelungsprozesse im rauen endoplasmatischen Reticulum sind von anderen Eiweißsezernierenden Zellen bekannt. Häufig allerdings kommt es nicht zu einer Stapelung der Syntheseprodukte, sondern Bildung und Ausstoß sind synchronisiert, d.h. sofort nach Fertigstellung verläßt das Produkt die Zelle (Merker 1964). Es gibt aber einige Beispiele, wo dieses synchrone Verhalten nicht die Regel ist. Am besten bekannt sind die Beispiele der Plasmazelle (Merker und Merker, 1962), der Fibroblasten (Schwarz und Merker, 1969) und der lysosomenhaltigen Zellen (Merker 1964).

In allen diesen Fällen kommt es immer, oder unter bestimmten Bedingungen zu einer Stapelung des Syntheseprodukts, das sich dann elektronenmikroskopisch

als Verdichtung des Inhalts, oder sogar durch eine Aufblähung der endoplasmatischen Hohlräume darstellt.

Die Bildung und Aufbewahrung der proteinreichen Matrix der späteren Melanosomen im endoplasmatischen Reticulums stellt deshalb kein neues Phänomen dar.

In Analogie zu anderen Eiweiß-sezernierenden Drüsenzellen, kann dann aus unseren elektronenmikroskopischen Bildern ein Transport der gebildeten Proteine in den Bereich des Golgi-Apparates vermutet werden.

Hier kommt es zu einer Abpackung in endgültiger Größe und zu einer Membranbegrenzung. Diese proteingefüllten Hohlräume wandern jetzt zu ihren typischen Lokalisationen und bereiten sich auf die Einlagerung des Melanins in die Matrix vor.

Dieser Gang der Ereignisse ist von verschiedenen Autoren auch schon an anderen melaninhaltigen Zellen beschrieben worden (Novikoff, Albala and Biempica, 1968; Stanka, Kinzel und Mohr, 1969; Stanka, 1969, 1970a; Hunter, Mottaz and Zelickson, 1970; Stanka, 1970b).

Von dem Zeitpunkt jedoch an, bei dem in der normalen Ratte die Melanineinlagerung stattfindet, verhindert in der Albinoratte ein genetischer Block die Melanisierung.

Zweifelloos enthält also die Pigmentepithelzelle der Albinoratte während der embryonalen Zeit die genetische Information für die Bildung der Prämelanosomen. Wie unsere Befunde zeigen, wird diese Information auch realisiert und dadurch elektronenmikroskopisch faßbar. Zum Verständnis dieser Vorgänge, besonders des Albino-problems, ist es aber wichtig zu wissen, daß im Pigment-

epithel der erwachsenen Ratte keine Prämelanosomen mehr zu finden sind (Dowling and Gibbons, 1962). Das bedeutet aber, daß die Zellen mit der Fähigkeit der Prämelanosomenbildung irgendwann zugrunde gehen oder aber, daß die Prämelanosomen jeweils in der Zelle lysosomal abgebaut werden.

Durch die Erarbeitung des Lysosomenbegriffs durch die DUVE und seine Schule, sind aber derartige Einschmelzungsprozesse von Cytoplasmabestandteile bekannt und in ihren biochemischen und morphologischen Sequenzen aufgeklärt. Geht man von diesen Vorstellungen aus, dann müßte in Analogie zu vielen anderen Zellarten, in denen ähnliche Vorgänge ablaufen, folgender Prozeß vermutet werden:

Um die einzuschmelzende Struktur bildet die Zelle eine Membran und sequestriert so dieses Areal vom übrigen Cytoplasma. In den so begrenzten Hohlraum werden nun vorher synthetisierte, und in primären Lysosomen gestapelte hydrolytische Enzyme abgegeben. Diese Enzyme werden jetzt aktiv und bauen den Inhalt als "autophagic vacuols" oder "Cytolysosomen" bezeichnete Einschlüsse ab (Merker, H.J., 1962; Novikoff, A.B., Essner, E., Quintana, N., 1964; Novikoff, A.B., Essner, E., 1962). Tatsächlich können in den späteren von uns untersuchten Tagen (Tag 15) Einschlüsse elektronenmikroskopisch dargestellt werden, die als solche Cytolysosomen gedeutet werden müssen.

Es kann deshalb auf Grund unserer Befunde und der geschilderten Vorstellungen angenommen werden, daß der bis zum Stadium der Prämelanosomen gebildete Pigmentapparat der embryonalen Pigmentzellen über

eine Aktivierung des lysosomalen Systems abgebaut wird.

Damit ergeben sich interessante Parallelen zu vielen anderen Abbauprozessen, die während der Morphogenese eine wesentliche Rolle spielen. Erinnert sei hier an Einzelzellnekrosen im Gehirn, an Einschmelzungen von Gewebsbezirken, z. B. die Interdigitalfalten, und sogar den Abbau ganzer Organe (Wolff/scher, Müller/scher Gang etc.) Wir können jetzt an den Anfang dieser Reihe einen Eliminationsvorgang stellen, der nur einen Teil einer Zelle trifft. Damit haben wir ein kontinuierliches System von Abbauvorgängen vor uns, dessen sich der embryonale Organismus bei der Ausprägung und Bildung des endgültigen Zustandes bedient.

Noch völlig unklar ist der Mechanismus, der die Melanineinlagerung in die Prämelanosomen verhindert und zweitens der Mechanismus, der das lysosomale System aktiviert.

Theoretisch könnte das Fehlen einer Pigmenteinlagerung sowohl auf der Unfähigkeit der Zellen beruhen, Melanin aufzubauen. Die andere Möglichkeit ist aber zweifellos nicht auszuschließen, daß die Prämelanosomen nicht in der Lage sind, Melanin zu binden und zu stapeln. Allein morphologisch lassen sich hier keine klaren Entscheidungen treffen.

Für die Stimulierung des cytolysosomalen Systems gibt es einige vergleichbare Beispiele in hormonabhängigen Geweben. Hier werden nach Wegfall von Hormonstimulation (Brandes, D.F., F.Gyorkey and D.P.Groth, 1962) (Verley, J.M. and K.H.Hollmann, 1967) Zellorganzellen funktionslos. Durch eine noch ungeklärte intrazelluläre

Kommunikation werden diese Zellbestandteile sequestriert und in Cytolysosomen eingeschmolzen. Die Ähnlichkeit beider Vorgänge ist verblüffend.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Entwicklung des Pigmentepithels der Retina bei der Ratte untersucht, da dieser bis jetzt in der Weltliteratur wenig Beachtung geschenkt wurde. Ebenfalls wurde die Melanogenese ausführlich besprochen.

Da diese Arbeit Grundlage für Untersuchungen über Mißbildungsentstehungen sein soll, wurde die Entwicklung von der Bildung des Augenbechers bis zum Auftreten der ersten typischen Pigmenteinschlüsse dargestellt, was bei dem von uns verwendeten Rattenstamm die Tage 12 bis 16 betrifft.

Am späten Tag 11 oder am frühen Tag 12 besteht das Pigmentepithel aus einer einschichtigen Lage kubischer Zellen, die noch keinerlei morphologische Kennzeichen ihrer späteren Differenzierungsrichtung aufweisen. Es kommt zur Ausbildung von Kontaktzonen, die in der amerikanischen Literatur als "tight junction" bezeichnet werden.

Ab Tag 12 lassen sich Strukturen nachweisen, die als Prämelanosomen bezeichnet werden. Es handelt sich um runde, ovale oder spindelige membranbegrenzte Einschlüsse, die eine geordnete Innenstruktur erkennen lassen.

Diese Innenstrukturen erkennt man als lamellenartige Verdichtungsplatten, denen feine Granula in regelmäßiger Folge aufsitzen.

Nur ganz selten lassen sich am Tag 14 solche Prämelanosomen darstellen, die beginnen, Melanin einzulagern, was sich elektronenmikroskopisch als Verbreiterung und Vergrößerung darstellt.

Zwischendurch, von uns beobachtet am 15. und 16. Tag, gehen in den Pigmentepithelzellen Abbauvorgänge vor sich. Einzelne oder gruppiert liegende Prämelanosomen werden durch eine Membran vom übrigen Cytoplasma abgegrenzt. Es sind hier typische Cytolysosomen entstanden, die prämelanotische Einschlüsse abbauen.

Die Prämelanosomenentstehung der Albinoratte im Gegensatz zur normalen Ratte wurde diskutiert. Der lysosomale Abbau wird besprochen.

LITERATUR

1. BAIRATI, A.J. and ORZALESI, N.
The ultrastructure of the pigment epithelium and the photoreceptor-pigment epithelium junction in the human retina.
J. Ultrastruct. Res. 9, 484 (1963)
2. BARNICOT, N.A. and BIRBECK, M.S.C.
The electron microscopy of human melanocytes and melanin granules.
In: The biology of hair growth, ed. by W. Montagna and R.A. Ellis, New York: Academic Press (1958)
3. BARNICOT, N.A., BIRBECK, M.S.C. and CHUCKOW, F.W.
The electron microscopy of human hair pigments.
Ann. hum. Genet. 19, 231-249 (1955)
4. BERNSTEIN, M.H.
Functional architecture of the retinal pigment epithelium.
Anat. Rec. 136, 164 (1960)
5. BIRBECK, M.S.C.
Electron microscopy of melanocytes
Brit. med. Bull. 18, 220-222 (1962)
6. BIRBECK, M.S.C.
Electron microscopy of melanocytes: the fine structure of hair bulb premelanosomes.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 100, 540-547 (1963)
7. BIRBECK, M.S.C., MERCER, E.H., BARNICOT, N.A.
The structure and formation of pigment granules in human hair.
Exp. Cell Res. 10, 505-514 (1955)
8. BRAEKEVELT, C.R. and HOLLENBERG, M.J.
Development of the retinal pigment epithelium, choriocapillaris and Bruch's membrane in the albino rat.
Exptl. Eye Res. 9, 124-131 (1970)
9. BRANDES, D.F., F. GYORKEY and D.P. GROTH
Fine structural and histochemical study of the effect of castration on the rat prostatic complex
Lab. Inv. 11, 339-350 (1962)

LITERATUR

10. BREATHNACH, A.S. and WYLLIE, L.M.A.
Ultrastructure of retinal pigment epithelium of the human fetus.
J. Ultrastruct.Res. 16,584-597 (1966)
11. BERNSTEIN, M.H. and PEASE, D.C.
Electron microscopy of the tapetum lucidum of the cat.
J.Biophysic. and Biochem.Cytol. 5,35 (1959)
12. DALTON, A.J.
Organization in benign and malignant cells.
Lab.Invest.8,510-537 (1959)
13. DALTON, A.J. and FELIX, M.D.
Phase contrast and electron micrography of the Cloudman S-91 mouse melanoma.
In: Pigment cell growth, ed.by M.Gordon, New York: Academic Press (1953)
14. de DUVE, C.
Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles, subcellular particles.
(T.Hayashi, editor), New York, the Ronald Press Co., 128 (1959)
15. DOWLING, J.E. and GIBBONS, I.R.
The fine structure of the pigment epithelium in the albino rat.
J.Cell.Biol. 14,459-474 (1962)
16. DROCHMANS, P.
Electron microscope studies of epidermal melanocytes and the fine structure of melanin granules.
J.biophys.biochem.Cytol. 8,165-180 (1960)
17. EPPIG, J.J.
Melanogenesis in amphibians.I. A study of the fine structure of the normal and phenylthiourea-treated pigmented epithelium in *Rana pipiens* tadpole eyes.
Z.Zellforsch.103,238-246 (1970)

LITERATUR

8. FEENEY, L., CRIESHABER, J.A. and HOGAN, M.J.
Studies on human ocular pigment:
In: The structure of the eye. II. Symposium.p.
535-548, ed.J.W.Rohen.Stuttgart: Schattauer (1965)
9. FINE, B.S.
Limiting membranes of sensory retina and pigment
epithelium: an electron microscopic study.
Arch.Ophthalmol. 66,847 (1961)
10. FRANCOIS, J., RABAEY,M., LAGASSE, A.
Electron microscopic observations on choroid,
pigment epithelium and pecten of the developing
chick in relation to melanin syntheses
Ophthalmologica (Basel) 146,415-431 (1963)
11. HU, F., CARDELL, R.R.
The ultrastructure of pigmented melanoma cells
in continuous culture.
J.invest.D rmatol. 42, 67-79 (1964)
12. HUNTER, J.A.A., MOTTAZ, J.H., ZELICKSON, A.S.
Melanogenesis: ultrastructural histochemical
observation on ultraviolet irradiated human
melanocytes.
J.invest.D rm. 51,213-221 (1970)
13. LASANSKI, A. and de FISCH, F.W.
Potential current and ionic fluxes across the
isolated retinal pigment epithelium and choroid-
J.Gen.Physiol. 43, 413 (1965)
14. LEESON, T.S. and LEESON, C.R.
The blood-retina barrier: A study of the chorio-
capillaries and lamina elastica of the rat. In:
Electron Microscopy: 6th Intern.Congr.Electron
Microscopy, (Kyoto), vol. 3, p.513 (Ed.by Uyeda, R.)
Maruzen, Tokyo (1966)
15. LERCHE, W.
Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die
Entwicklung der Pigmentgranula in der Netzhaut
menschlicher Embryonen.
Albrecht v. Graefes Arch.Ophthal. 164,543-545 (1962)

LITERATUR

26. LERCHE, W.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Differenzierung des Pigmentepithels und der äußeren Körnerzellen (Sinneszellen) im menschlichen Auge.
Z.Zellforsch. 58, 953-970 (1963)

27. LERCHE, W. and WULLE, K.-G.

Über die Genese der Melaningranula in der embryonalen menschlichen Retina.
Z.Zellforsch. 76, 452-457 (1967)

28. LEURE-DU PREE, A.

Ultrastructure of the pigment epithelium in the domestic sheep.
Am.J.Ophthalmol. 65, 383-398 (1968)

29. LIEB, W.A. und KNAUF, H.

Bruch'sche Membran und Pigmentepithel der Netzhaut (Elektronenmikroskopische Untersuchungen)
Klin.Monatsbl.f.Augenheilkunde Bd. 143 S.204-216 (1963)

30. MATSUSAKA, T.

The intracytoplasmic channel in pigment epithelial cells of the chick retina.
Z.Zellforsch. 81, 100-113 (1967)

31. MAUL, G.G.

Golgi-melanosome relationship in human melanoma in vitro.
J.Ultrastruct. Res. 26, 163-176 (1969)

32. MERKER, W. und MERKER, J.H.

Das elektronenmikroskopische Bild der Plasmazellen aus der Milz und den Lymphknoten von Ratte, Maus und Kaninchen.
Beitr. Silikoseforsch. H.75, 25-58 (1962)

33. MERKER, H.J.

Die Lysosomen, eine neue Zellorganellengruppe.
Berl.Medizin. 15, 237-244 (1964)

34. MOYER, F.H.

Electron microscope observations on the origin development, and genetic control of melanin granules in the mouse eye.
In: The structure of the eye, ed.by G.K.Smelser, New York: Academic Press (1961)

LITERATUR

35. MOYER, F.H.

Genetic effects on melanosome fine structure and ontogeny in normal and malignant cells.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 100, 497-544 (1963)

36. MOYER, F.H.

Genetic variations in the fine structure and ontogeny of mouse melanin granules.
Amer.Zoologist 6, 43-66 (1966)

37. MYERS, D., MIGHTON, T., RAYUS, D.

Acid mucopolysaccharides closely associated with collagen fibrils in normal human synovium.
J.Ultrastruct.Res. 20, 243, 25 (1969)

38. NAKAI, T., SHUBIK, Ph.

Electronmicroscopic radioautography: the melanosome as a site of melanogenesis in neoplastic melanocytes.
J.invest.Dermatol. 43, 267-269 (1964)

39. NOVIKOFF, A.B., ALBALA, A. and BIEMPICA, L.

Ultrastructural and cytochemical observations on B-16 and Harding-Passey mouse melanomas. The origin of premelanosomes and compound melanosomes.
J.Histochem.Cytochem. 16, 299-319 (1968)

40. NOVIKOFF, A.B., ESSNER, E., QUINTANA, N.

Golgi Apparatus and lysosomes
Fed.Proceed. 23, 1010 (1964)

41. NOVIKOFF, A.B., ESSNER, E.

Cytological studies and two functional hepatosomes. Interrelations of endoplasmatic reticulum, golgi apparatus and lysosomes.
J.Cell.Biol. 15, 140 (1962)

42. PORTER, K.R. and YAMADA, E.

Studies on the endoplasmic reticulum. V. Its form and differentiation in pigment epithelial cells of the frog retina.
J.biophysic.biochem.Cytol. 8, 181 (1960)

43. SCHWARZ, W. und MERKER, H.J.

Die Fibrillogenese in verschiedenen Bindegewebsformen des menschlichen Embryos.
Beitr. Sillkoseforsch. Sonderband 4, 231-240 (1960)

LITERATUR

44. SEIJI, M.
Subcellular tyrosinase activity and site of melanogenesis in melanocytes.
In: Structure and control of the melanocyte. Sixth Intern.Pigment Cell. Conf., Sofia 1965, p. 123-133.
Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966
45. SEIJI, M.
Subcellular particles and melanin formation in melanocytes.
In: Advances in biology of skin.vol.VIII, The pigimentary system p.189-222 (ed.w.Montagna and F.Hu)
Pergamon Press: 1967
46. SEIJI, M., FRITZPATRICK, T.B., and BIRBECK, M.S.C.
The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis.
J.invest.Derm.36, 243-252 (1961)
47. SEIJI, M., IWASHITA, S.
Intracellular localization of tyrosinase and site of melanin formation in melanocyte.
J.invest.Derm.45, 35-314 (1965)
48. SEIJI, M., SHIMAO, K., BIRBECK, M.S.C., and FRITZPATRICK, T.B.
Subcellular localization of melanin biosynthesis.
Ann.N.Y.Acad.Sci.100, 497-533 (1963)
49. STANKA, P.
Elektronenmikroskopische Untersuchung melaninbildender Zellen mit Hilfe der Dopa-Reaktion.
Gem.Tag.Österr.Arbeitsgem.Ultrastrukturforsch.
Deutsche Ges.Elektronenmikr.Wien 1969
50. STANKA, P.
Die Dopa-Reaktion, eine brauchbare Methode in der Elektronenmikroskopie. Untersuchung am retinalen Pigmentepithel von Hühnerembryonen.
Mikroskopie 26, 109-174 (1970a)
51. STANKA, P.
Elektronenmikroskopisch-zytochemische Lokalisation von Tyrosinase-Aktivität. IV.Symp.Derm.Brno 1970 b

LITERATUR

52. STANKA, P., KINZEL, V. und MOHR, U.
Elektronenmikroskopische Untersuchung über die
Prämelanosomenentstehung an Melanomzellen in vitro.
Virchow's Arch.Abt.B Zellpath.2, 91-102 (1969)
53. STANKA, P.
Elektronenmikroskopische Untersuchung über die
Prämelanosomenentstehung im retinalen Pigmentepithel
von Hühnerembryonen.
Z.Zellforsch.112, 120-128 (1971)
54. VERLEY, I.M. and HOLLMANN, K.H.
La regression de la glande mammaire, 1967
55. WELLINGS, S.R. and SIEGEL, B.V.
Role of Golgi-apparatus in the formation of melanin
granules in human malignant melanoma.
J.Ultrastruct.Res.3, 147-154 (1959)
56. WELLINGS, S.R. and SIEGEL, B.V.
Electron microscopic studies on the subcellular
origin and ultrastructure of melanin granules in
mammalian melanomas.
Ann.N.Y.Acad.Sci.100, 548-554 (1963)
57. YAMADA, E.
The fine structure of the pigment epithelium in
the turtle eye. The structure of the eye, (ed. by
Smelser) New York, Acad.Press 1961
58. YAMADA, E., TOKOYASU, K. and Iwaki, S.
The fine structure of the retina studied with the
electron microscope. II. Pigment epithelium and
capillary of the choriocapillary layer.
J.Electron Microscopy (Tokyo) 6,42 (1958)

BILD 1

Basalschicht des Pigmentepithels aus der Augen-
anlage eines Rattenembryos des Tages 12.

Zum Mesenchym hin eine angedeutete Basalmembran (BM)
zwischen den Zellen enge (↓) oder weite (*)
Interzellularräume. Im Cytoplasma die ersten kleinen
elektronendichten Pigmentgranula (#→)

N= Nucleus ○= freie Ribosomen

Vergrößerung 1 : 65 000

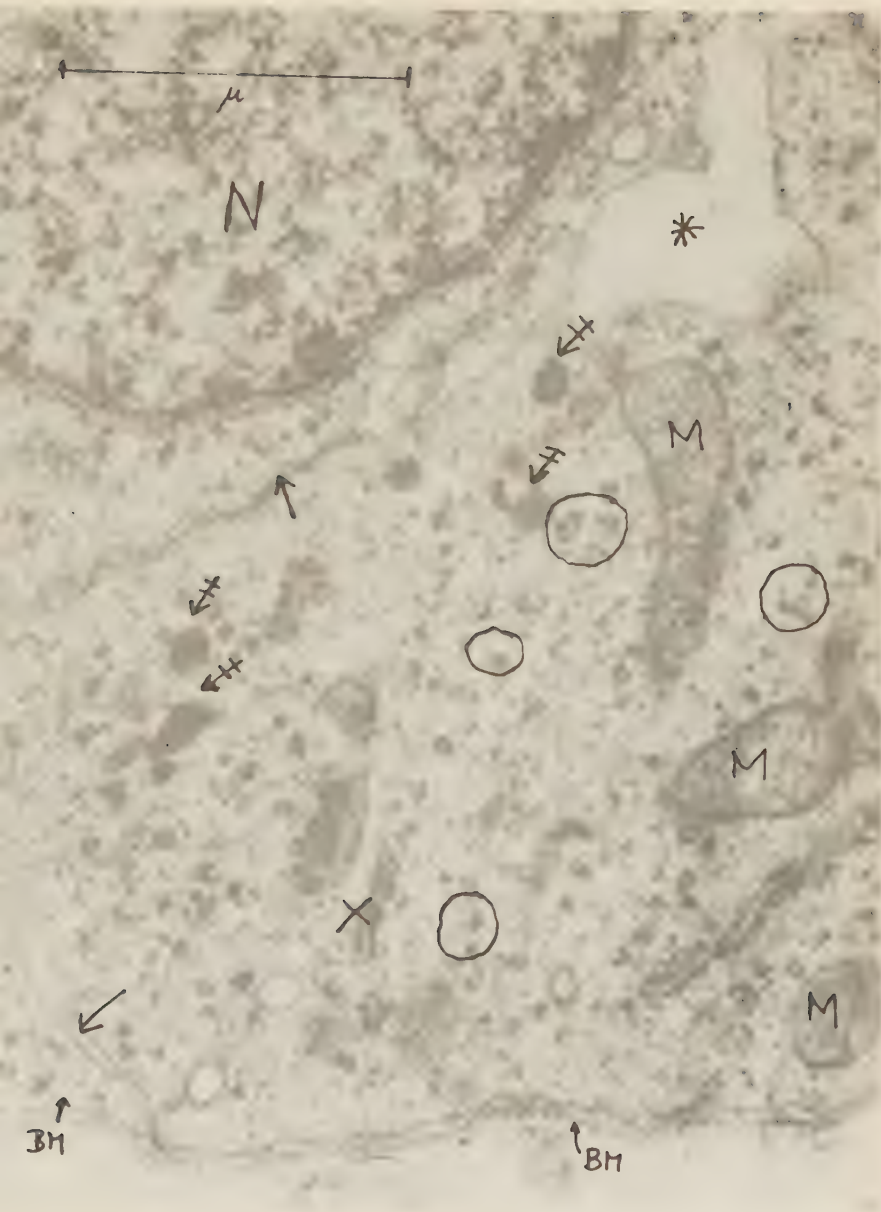


BILD 2

Wie Abb. 1

Im Cytoplasma bereits deutlich lamellierte
Pigmentgranula.

Vergrößerung 1 : 49 000

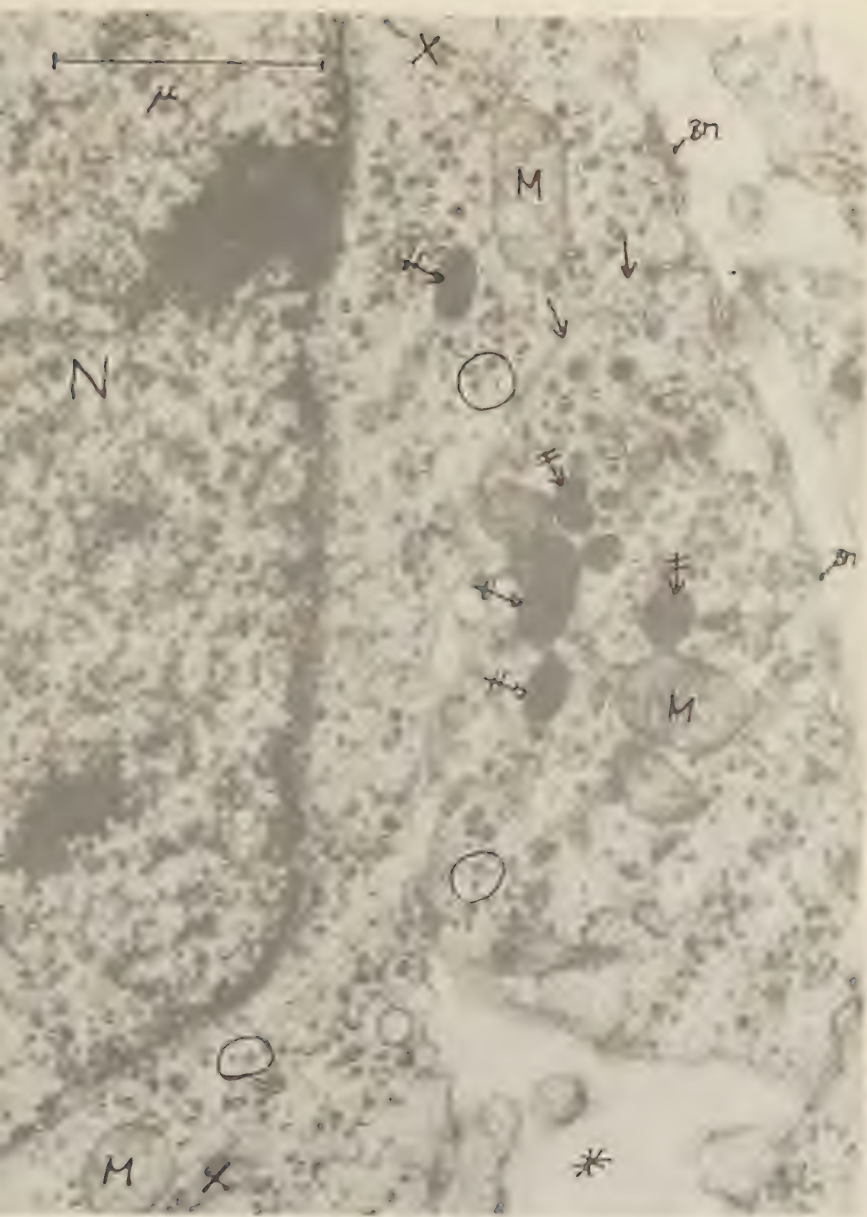


BILD 3

Basalschicht des Pigmentepithels aus der Augen-
anlage eines Rattenembryos des Tages 12.

Zum Mesenchym hin eine angedeutete Basalmembran (BM),
Zwischen den Zellen enge (↓) oder weite (*)
Interzellularräume. Im Cytoplasma die ersten kleinen
Pigmentgranula (↗) und die ersten lamellierten
Granula (⇒). Bei N₁ ein tangential getroffener
Kern mit Kernporen (⚙).

Vergrößerung 1 : 42 000

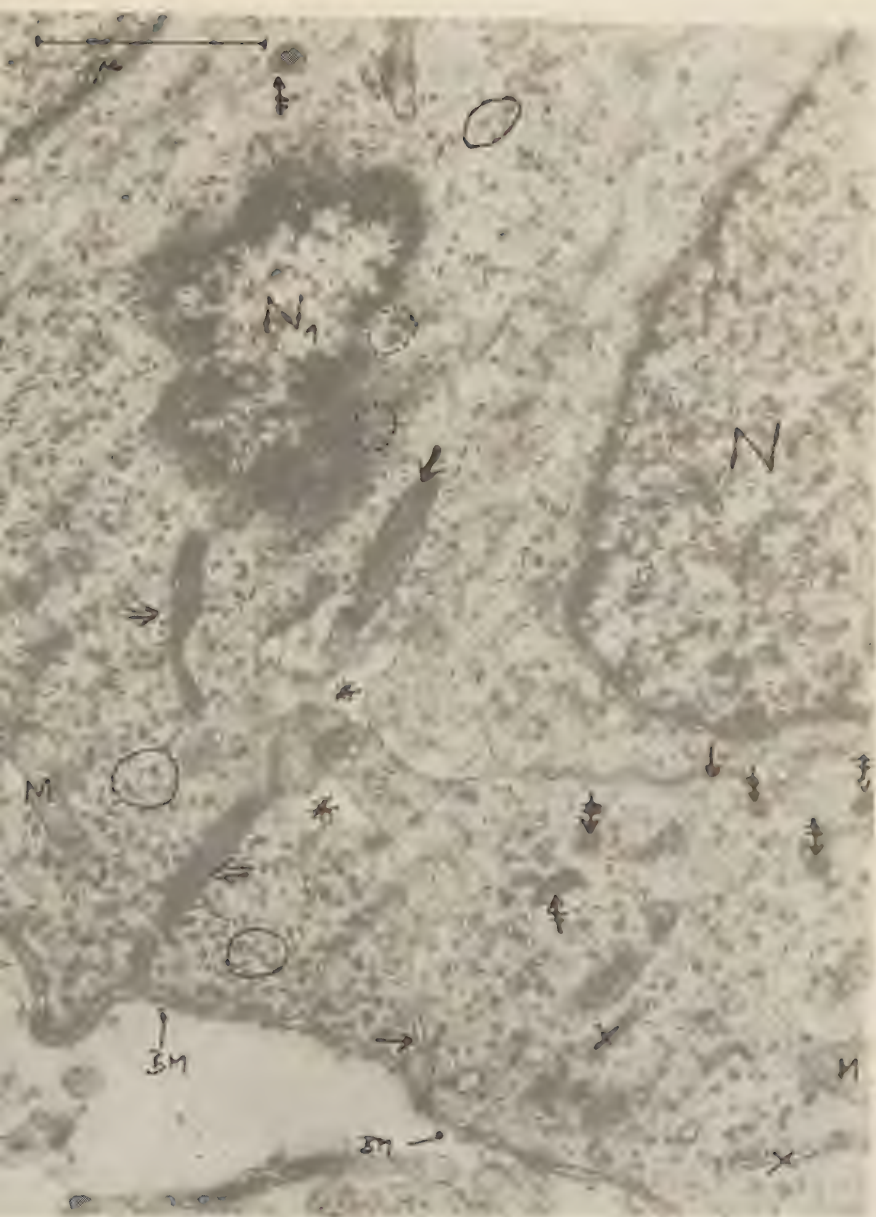


BILD 4

Übersichtsbild fast der gesamten Pigmentschicht
aus der Augenanlage eines Rattenembryos vom Tag 12.

Basalmembran zum Mesenchym hin (BM), erweiterte
Interzellularräume (~~*~~).

N= Nucleus M= Mitochondrien, (→) Pigmentgranula
(○) freie Ribosomen

Vergrößerung 1 : 21 000

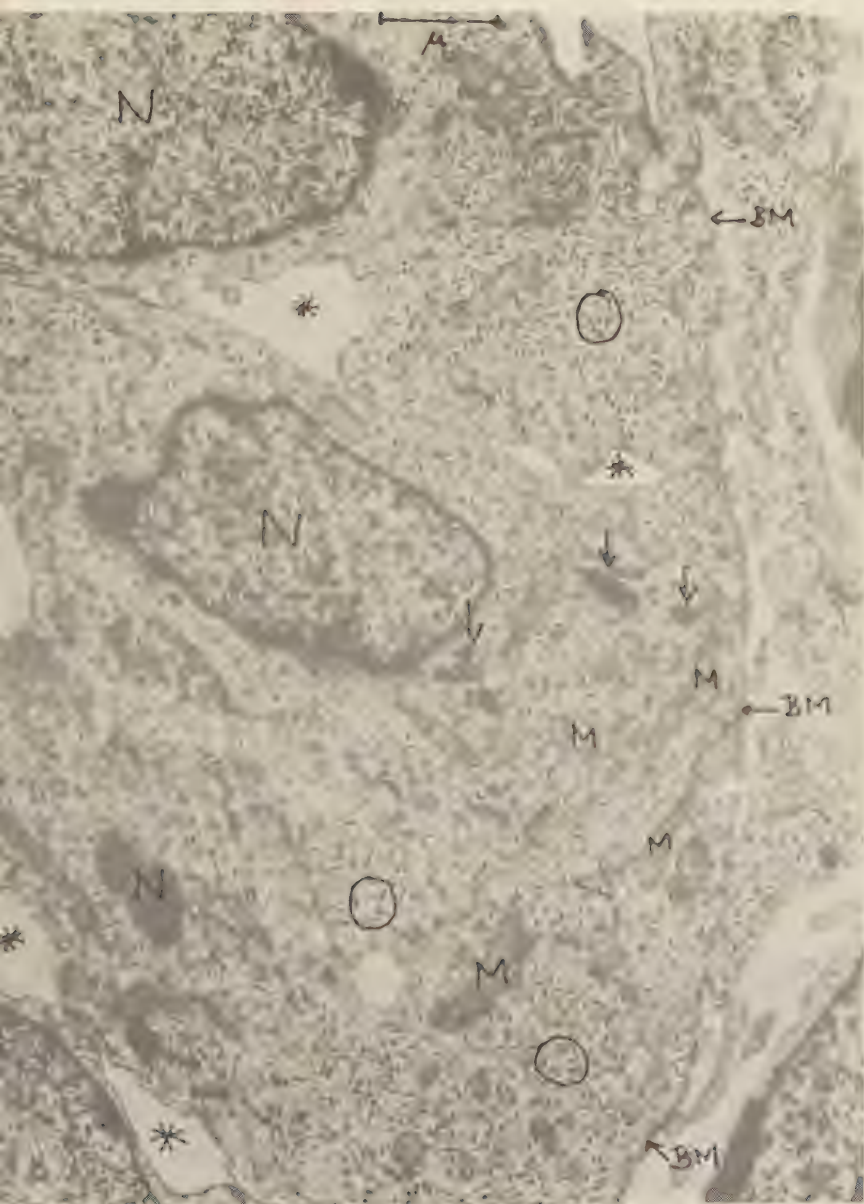


BILD 5

Ausschnitt mit höherer Vergrößerung aus Abb. 5.

BM= Basalmembran zum Mesenchym hin

(*)= Intercellularraum

Im Cytoplasma zahlreiche Mitochondrien (M)

Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Reticulums (X)

Freie Ribosomen (O), sowie kleine noch unstrukturierte (→) und größere lamellierte Pigmentgranula.

Vergrößerung 1 : 56 000

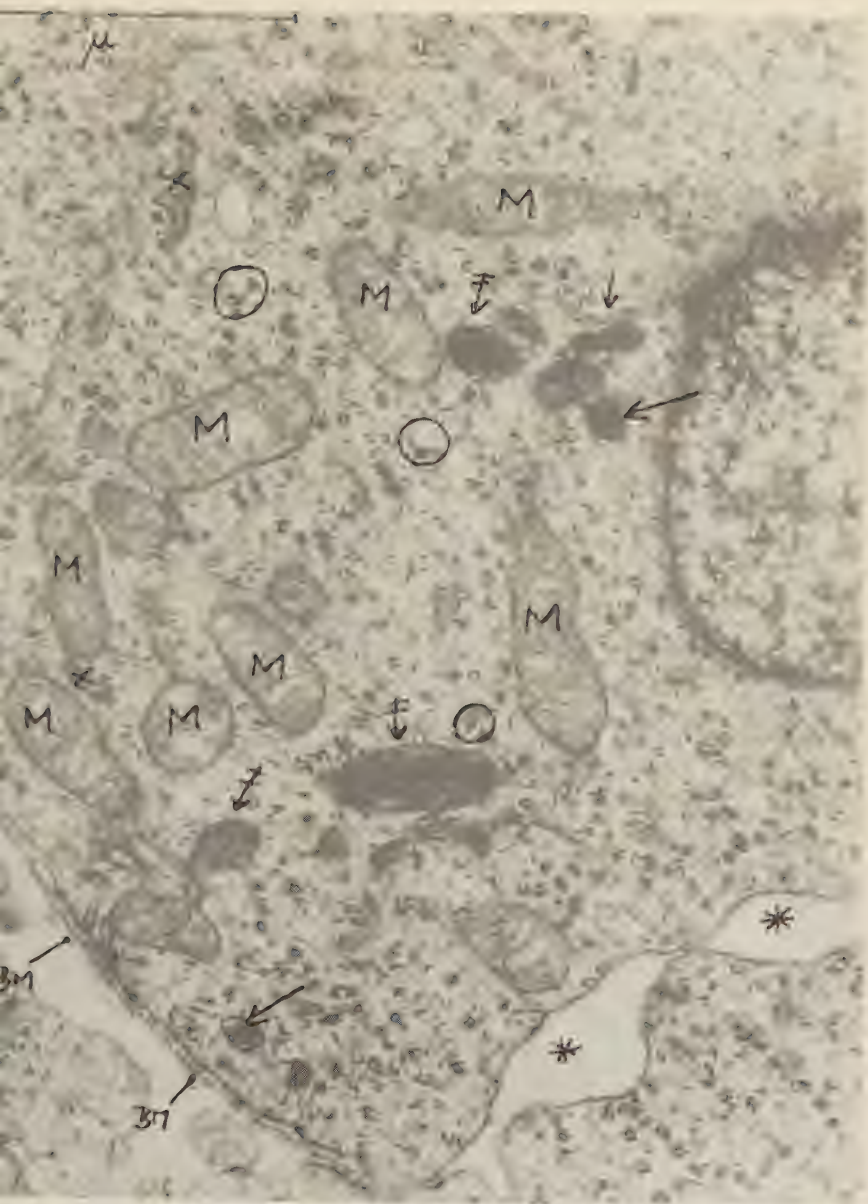


BILD 6

Mehr apikaler Teil der Pigmentepithelzelle aus der Augenanlage eines Rattenembryos des Tages 12 mit einem gut ausgeprägten Golgi-Apparat (G), einigen membranbegrenzten Hohlräumen mit Inhalt (↓).

Zahlreiche Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Reticulums (X), Mitochondrien (M) und freie Ribosomen.

Vergrößerung 1 : 49 000

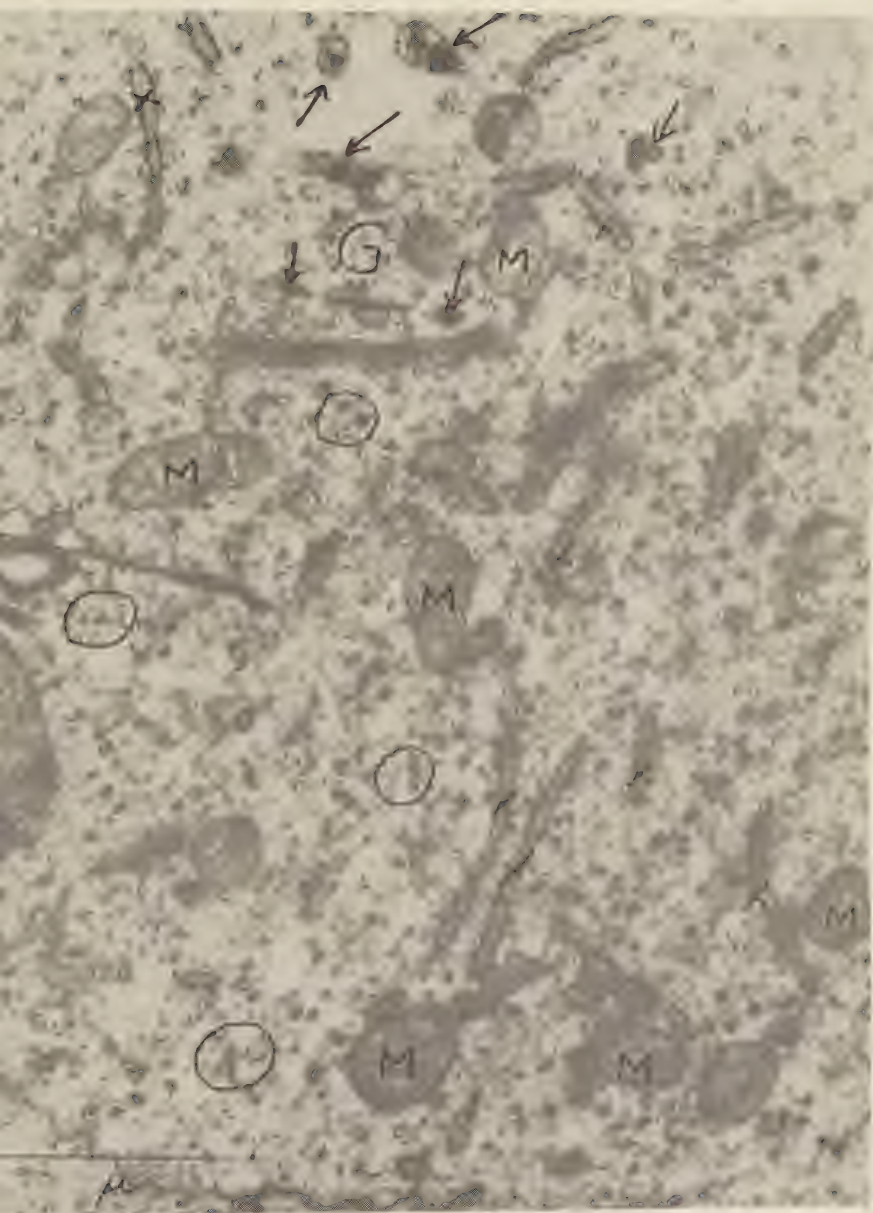


BILD 7

Basaler Teil der Pigmentzelle aus der Augenanlage
eines Rattenembryos. Basalmembran (BM)

Im Cytoplasma bereits größere lamellierte Hohlräume,
die teilweise in Schläuche des endoplasmatischen
Hohlraums übergehen.

(Ausschnittvergrößerung aus Abb. 3)

N= tangential geschnittener Nucleolus

() = Ribosomen, M = Mitochondrien,

ZM = Zellmembran

Vergrößerung 1 : 70 000

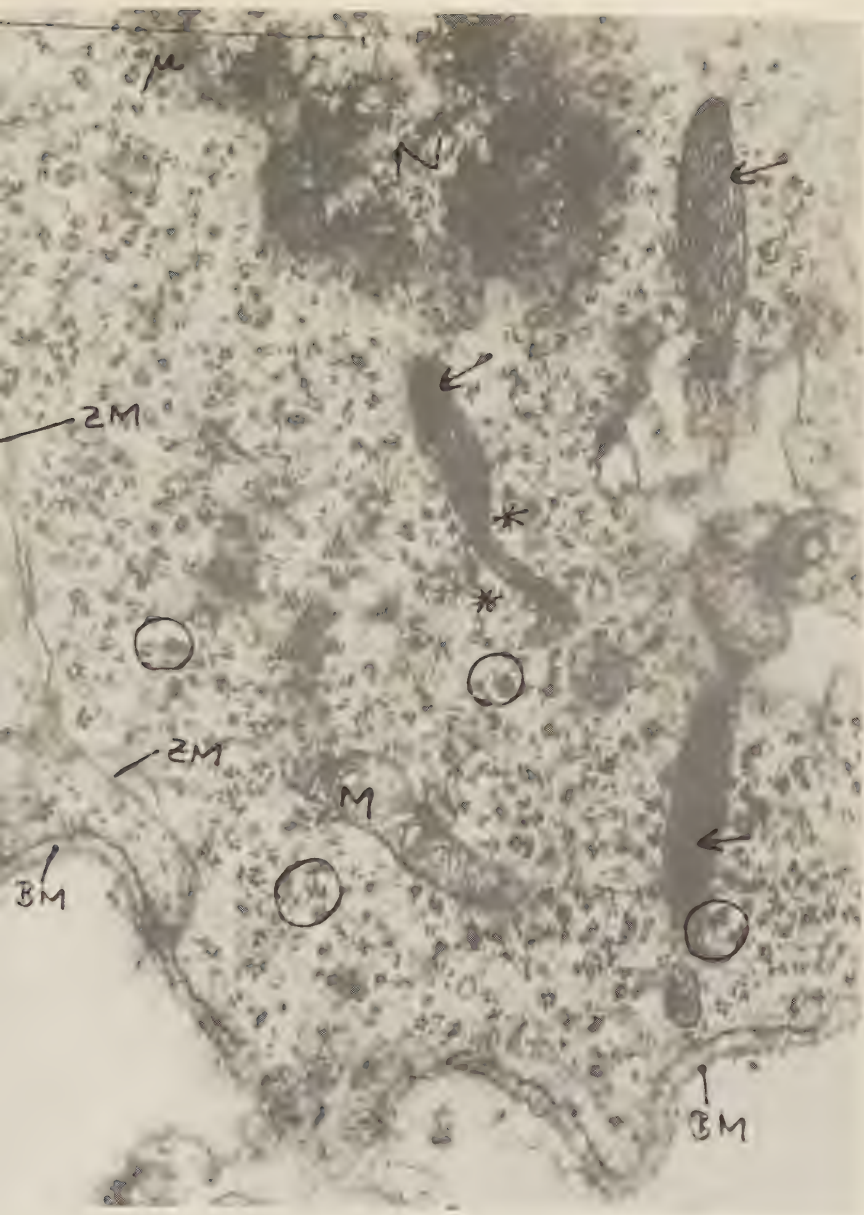


BILD 8

Übersichtsbild vom Pigmentepithel und Teilen der Retina (R) aus der Augenanlage eines Rattenembryos des Tages 15. Im Pigmentepithel zahlreiche gequollene lamellierte Körperchen im apikalen Bereich der Zellen (→) und ein Fehlen anderer Zellorganellen.

Vergrößerung 1 : 21 000

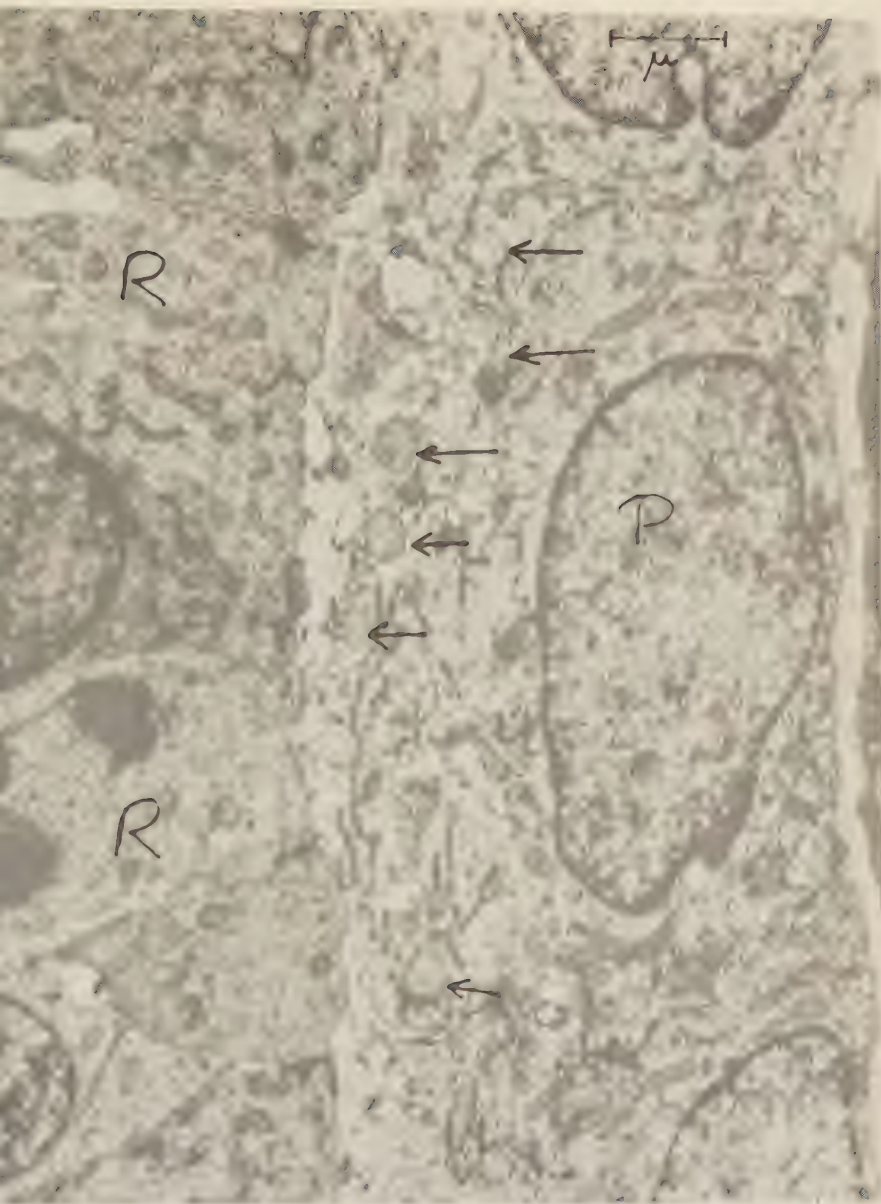


BILD 9

Höhere Vergrößerung aus der Augenanlage des Ratten-embryos des Tages 15 mit Retinazellen (R) und Pigmentzelle (P).

Im Cytoplasma aufgequollene lamellierte Körperchen (→)
und Basalkörper von Cilien (✱).

Vergrößerung 1 : 49 000



BILD 10

Wie Abbd. 9

Lamellierte Körperchen noch weiter geschwollen (→).
Die übrigen Zellorganellen unverändert

Vergrößerung 1 : 49 000



BILD 11

Wie Abbd. 9

Die lamellierten Körperchen zu weilen (x_1 und x_2)
dicht gepackt und von einer zusätzlichen Membran
umgeben (~~##~~→)

(Wie lysosomenähnliche Körperchen)

Vergrößerung 1 : 49 000



L E B E N S L A U F

Ilse K u n z, geboren am 8.10.1946 als Tochter
des Kaufmanns Gotthilf Kunz und seiner Ehefrau
Berta geb. Knödler in Welzheim (Württ.)

1953-1957	Volksschule Gschwend
1957-1963	Progymnasium Gaildorf
1963-1966	Mädchengymnasium Schwäb.Hall
1966-1969	Medizinstudium an der F.U. Berlin
1969-1970	Studium an der Universität Hamburg
16.2.1973	Staatsexamen an der F.U. Berlin



